

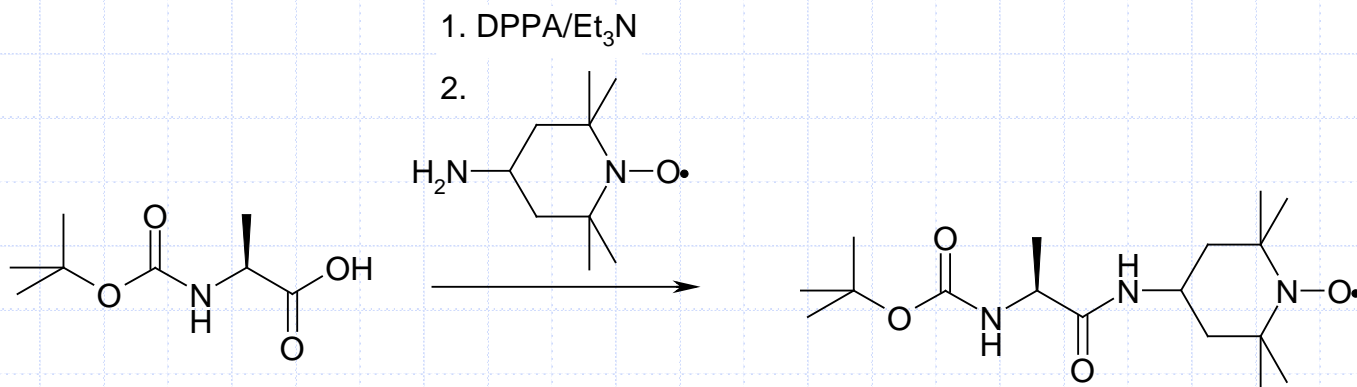


Katedra za farmacevtsko kemijo

TPK kiralnih spojin in kolonska kromatografija

Pregled predpisa 1; zmes, ki jo ločujemo

- ◆ Reakcija: tvorba amidne vezi preko aktivacije kisline v obliki azida
- ◆ Produkt in izhodni amin sta nitroksidna radikala (o tem kasneje - antralin); oba sta intenzivno obarvana



Pregled predpisa 1

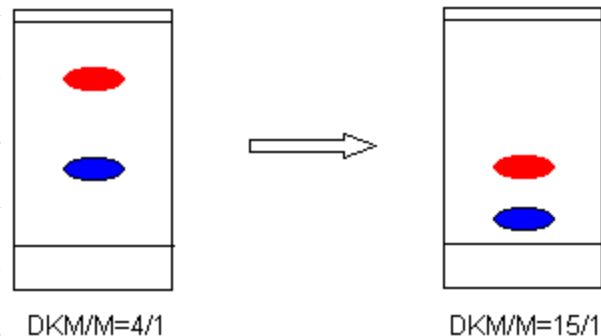
◆ Ločevanje zmesi na stolpcu silikagela z izbrano optimalno mobilno fazo

1) Izbira optimalne mobilne faze s pomočjo TPK:

- ločba v izbrani MF naj bo čim boljša

- ustrezen R_f nato dosežemo s spremembo bolj lipofilne komponente MF. Npr., dobro ločbo dobimo v $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=4/1$, vendar sta R_f komponent zmesi previsoka; v $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=15/1$ dobimo ustrezna R_f (R_f najvišje lise naj bo $\sim 0,3$).

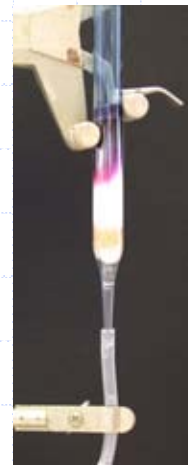
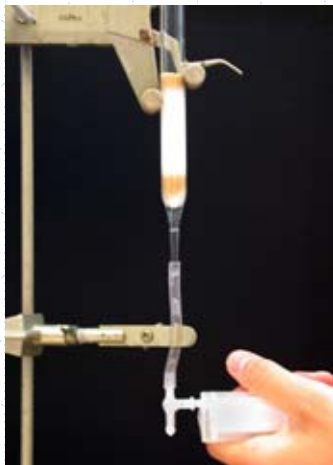
- Zakaj R_f 0,3?



Pregled predpisa 1

◆ Ločevanje zmesi na stolpcu silikagela z izbrano optimalno mobilno fazo

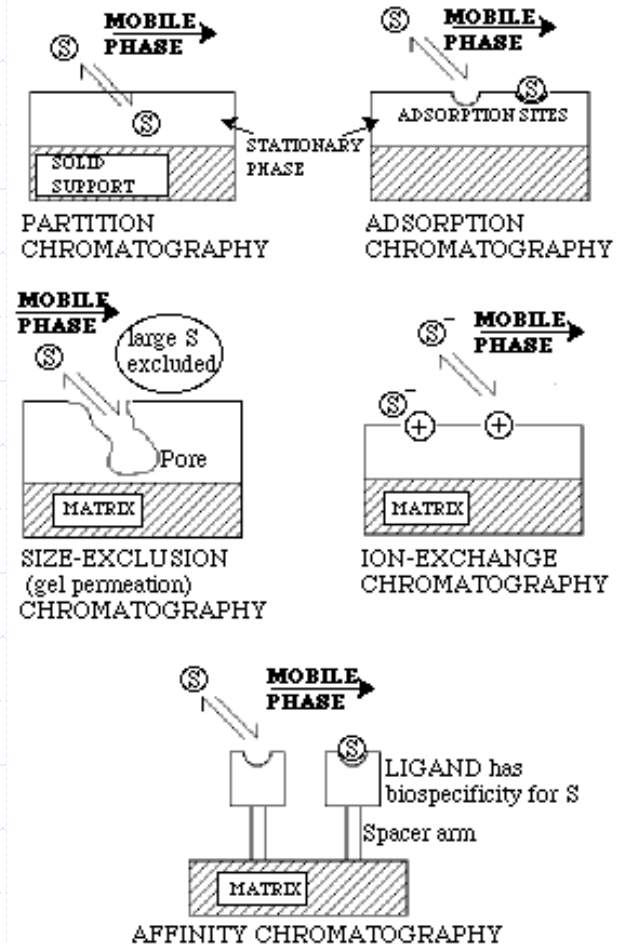
- 2) Kolono napolnimo najprej z MF (izženemo zrak). Napolnimo kolono z v izbrani MF omočeno SF. SF se med omočenjem segreje. Zakaj?
- 3) Nanesemo vzorec raztopljen v MF. Dopolnimo z MF.
- 4) Začnemo z elucijo. Zbiramo frakcije. Frakcije analiziramo s TPK.
- 5) Frakcijam uparimo topilo in analiziramo (NMR, IR, MS, elementna analiza, določanje tališča).



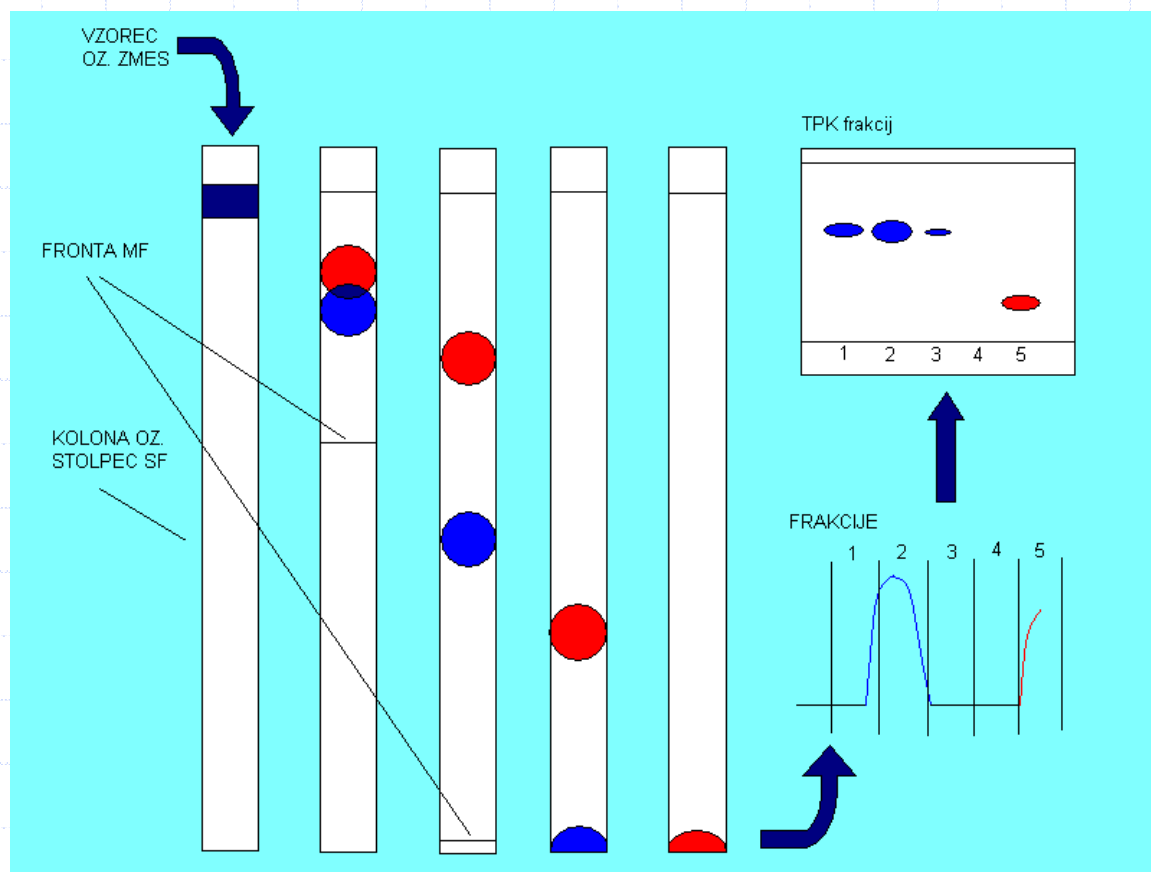
Zbiranje frakcij
Analiza frakcij

Kolonska kromatografija

- ◆ SF v stolpcu
- ◆ Sistem trdno-tekoče (poznamo tudi trdno-plinsko ali tekoče-plinsko)
- ◆ Adsorpcijska kromatografija (v našem primeru, glej sliko)



Princip kromatografske ločbe na koloni (stolpcu)



Procesi, ki potekajo med ločbo na koloni

- ◆ Elucija
- ◆ Retencija
- ◆ Separacija
- ◆ Disperzija

Elucija

- ◆ Izokratska – vseskozi enaka sestava MF
- ◆ Frakcionalna – ko eluiramo eno komponento, spremenimo MF
- ◆ Gradientna – MF spreminjamo med eluiranjem

Retencija – zadrževanje na koloni

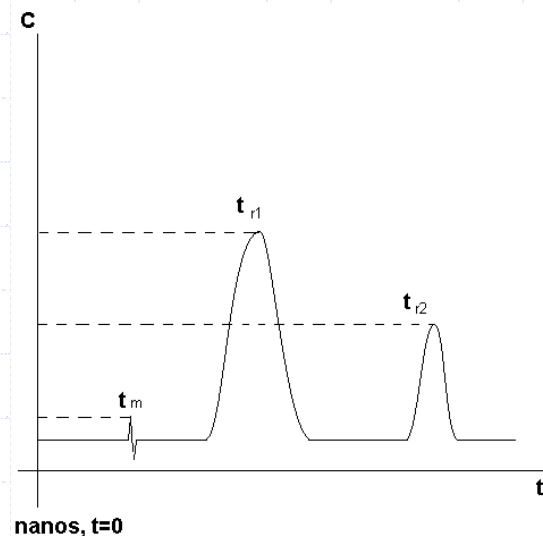
- ◆ Merilo adsorpcije, opišemo z adsorpcijskim koeficientom Q (velja za dano spojino v danem kromatografskem sistemu):

$Q = C(\text{adsorbent}) / C(\text{MF})$ $Q \sim 0$; spojina se ne adsorbira, $Q \sim \infty$; spojina ne potuje

- ◆ t_r – retencijski čas; lastnost spojine v danem kromatografskem sistemu, uporaben parameter za identifikacijo spojin

Separacija oz. ločitev

- ◆ Povečuje se z razliko med maksimumoma dveh sosednjih komponent: $t_{r2} - t_{r1}$ (t_m ...ret. čas MF)
- ◆ $t_{r2} - t_{r1} = 1/u \times (k_2 - k_1) \times l$ (u ...hitrost migracije mobilne faze, k_x ...kapacitivni faktor posamezne komponente, l ...dolžina kolone)
 k_x ...vrednost od 0- ∞ , 0...komponenta se ne adsorbira, ∞ ...komponenta ne potuje
- ◆ Iz zgornje enačbe: separacija narašča z dolžino poti (kolone) in razliko med kapacitivnima faktorjema spojnin pri dani hitrosti elucije



Disperzija

- ◆ Antagonistični proces separaciji, gre za širjenje con med migracijo vzorca (topljenca) skozi kolono
- ◆ Posledica – spojina se eluira v večjem volumnu in manjši koncentraciji, kot je bila vanjo nanešena
- ◆ Koncentracija vzorca v eluatu se porazdeljuje po Gaussovi krivulji; širina bazne linije te krivulje je merilo za disperzijo
- ◆ Merilo za disperzijo je širina bazne linije:
 $W_b = 4\sigma$ (W_b -širina vrha ali "peaka", σ -stand. deviacija v enotah dolžine, volumna, časa)
 $\sigma^2 \sim l$ (σ^2 -varianca vrha, l -dolžina kolone)
- ◆ Odvisna od dolžine kolone

Disperzija

- ◆ Efekt množice poti: pot skozi kolono ni ravna, čimmanjši delci, čimbolj enakomerne oblike in velikosti – boljša enakomernost poti, manjša disperzija
- ◆ Naključna molekularna difuzija v aksialni smeri kolone – efekt je pomemben pri počasnejših pretokih
- ◆ Upor proti difuziji molekul iz ene v drugo fazo – za prehod je potrebna določena energija

Uporaba kolonske kromatografije

- ◆ Kvantitativna ločba (sparacija) zmesi na posamezne komponente
- ◆ TPK – večinoma kvalitativna ločba: sledenje poteka reakcij, analiza heterogenosti oz. homogenosti vzorca
- ◆ HPLC, GC – tudi kolonski kromatografiji, večinoma kvalitativna ločba. Boljša ločba zaradi visokega pritiska in manjših delcev SF

Pregled predpisa 2

◆ Kromatografija enantiomerov s kiralno stacionarno fazo

- 1) Sušenje plošč CHIRALPLATE; 15 min. v sušilniku (zakaj?). Pošče so reverznofazne, s kiralnim selektorjem.
- 2) Nanos: L-Ala, D-Ala, zmes obeh
- 3) Nanos: γ -Bn-L-Glu, γ -Bn-D-Glu, zmes obeh
- 4) Razvijanje v nasičeni kadički z MF MeOH/voda/acetonitril=1/1/5; kaj bi se zgodilo s povečanjem ali zmanjšanjem deleža acetonitrila?
- 5) Vizualizacija z oroševanjem. Ali bi videli katero od spojin?
Ločitev na osnovi tvorbe diastereomernih kompleksov
Bolj je kompleks stabilen, počasneje potuje spojina

Kiralnost

◆ Lastnost, da kiralna spojina ni enaka svoji zrcalni sliki

◆ Vzroki za kiralnost:

- 1. Stereogeni center*** - najpogosteje C atom (redkeje Si, N, P, S – prosti el. Par kot substituent!) , s 4-imi različnimi substituenti. Spojina s stereogenim centrom ni nujno kiralna (npr. mezo spojine).
- 2. Stereogena os*** – omejena vrtljivost (npr. različni o-substituirani difenili, kumuleni s sodim št. dvojnih vezi)
- 3. Stereogena ravnina*** - nenasičene spojine

*Primeri na tabli, v M.Tišler: Organska kemija

Kiralnost

◆ ENANTIOMERA

- molekuli sta si med seboj zrcalni sliki, vse razdalje med atomi so enake, ne razlikujejo se po fiz.-kem. lastnostih razen v smeri zasuka linearno polarizirane svetlobe
- ni možna ločitev v nekiralnem okolju

◆ DIASTEREO(IZO)MERI

- več stereogenih centrov, razdalje med atomi so različne, zato razlike v fiz.-kem. lastnostih
- možna ločba: razlika v topnosti (selektivna kristalizacija), razlike v interakcijah (kromatografija), razlike v vrelišču (destilacija)

Princip ločbe na kiralni SF

- ◆ Enantiomerov ne moremo ločiti v nekiralnem okolju; lahko pa tvorimo DIASTEREOMERNE INTERAKCIJE – spojine za hip postanejo diastereomeri – možna ločba
- ◆ V našem primeru C-18 reverznofazni silikagel s kovalentno pripetim L-prolinom (kiralni selektor) + Cu^{2+} ioni – tvorijo se interakcije (kelati, kompleksi) med Cu^{2+} ioni in nanešeno spojino. Ti kompleksi so DIASTEREOMERNI (kompleks ima 2 stereogena centra).
- ◆ Ločitev temelji na različno stabilnih/močnih kompleksih. Bolj ko je kompleks stabilen, počasneje potuje spojina.

Pomen kiralnosti

◆ V naravi prevladujejo:

L-aminokisljine

D-sladkorji

◆ Receptorji v našem telesu so 3D strukture – sposobni so kiralne diskriminacije; različno močno vežejo enantiomere zdravilnih učinkovin

◆ EUTOMER – bolj učinkovit enantiomer

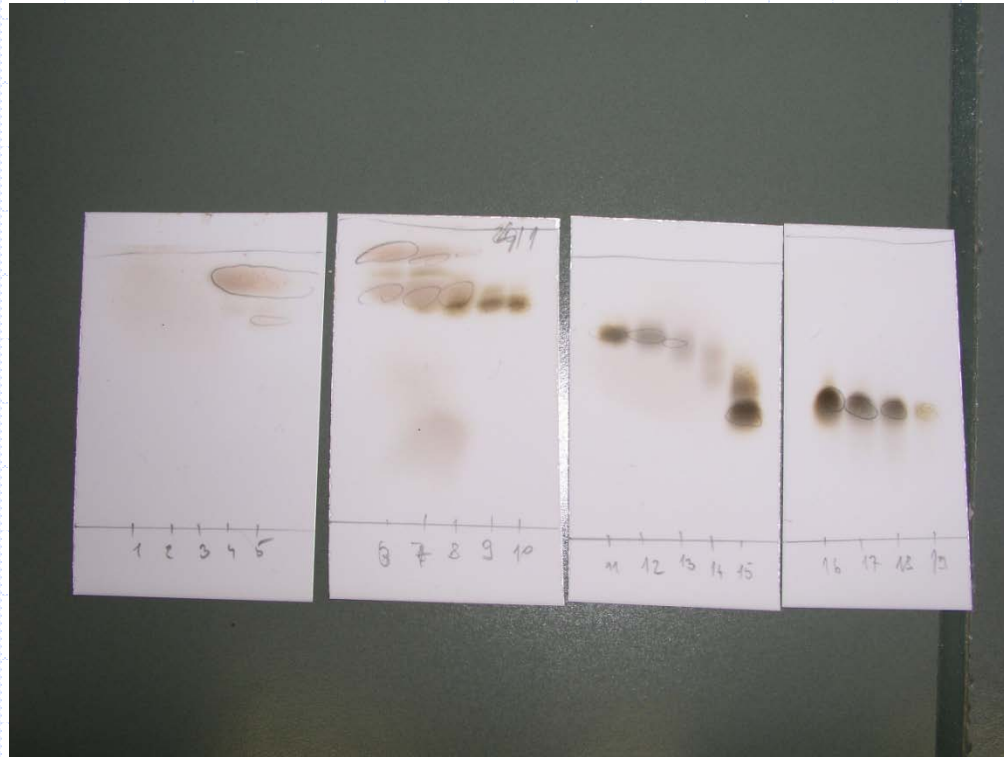
◆ DISTOMER – manj učinkovit enantiomer

◆ Eudizmično razmerje = aktivnost eutomera / aktivnost distomera

◆ Enantiomera imata lahko tudi popolnoma različne učinke, tudi visoko toksične (npr. talidomid, R-sedativ, S-teratogen)

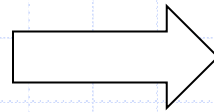
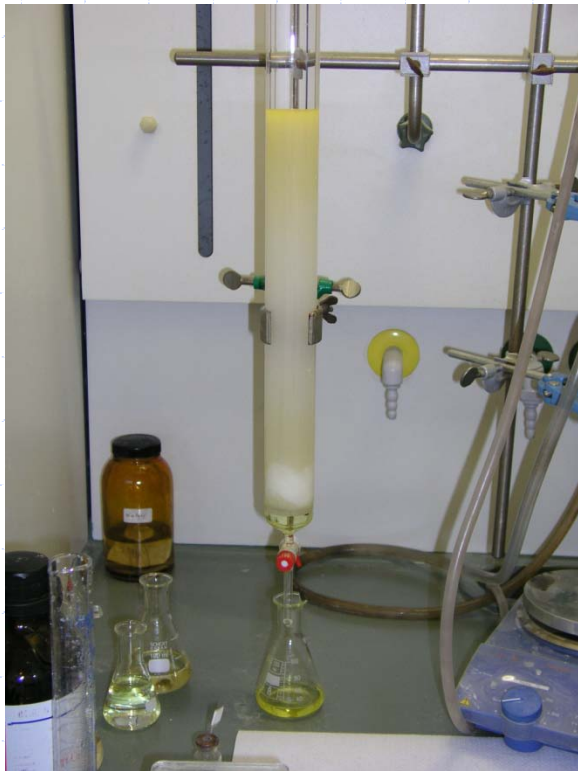
Evolucija kromatografije

◆ TPK



Evolucija kromatografije

◆ Kolonska kromatografija



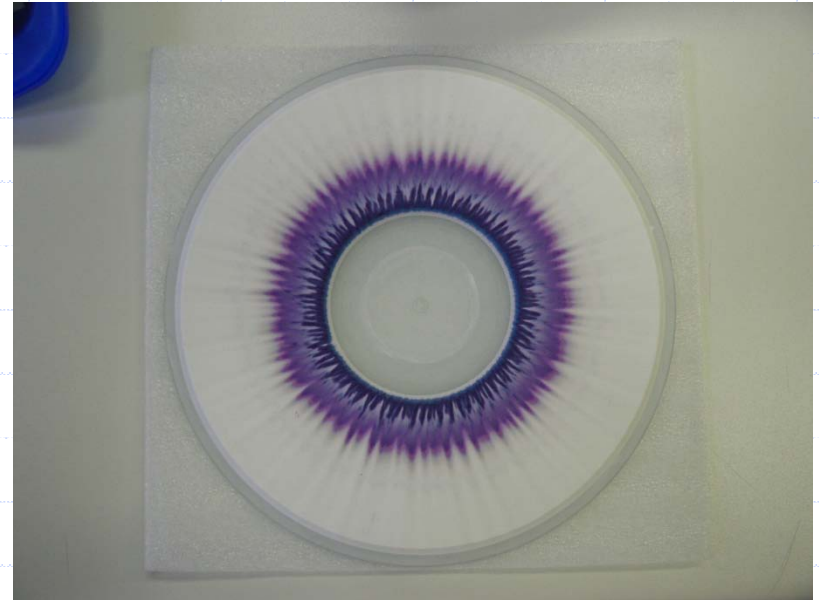
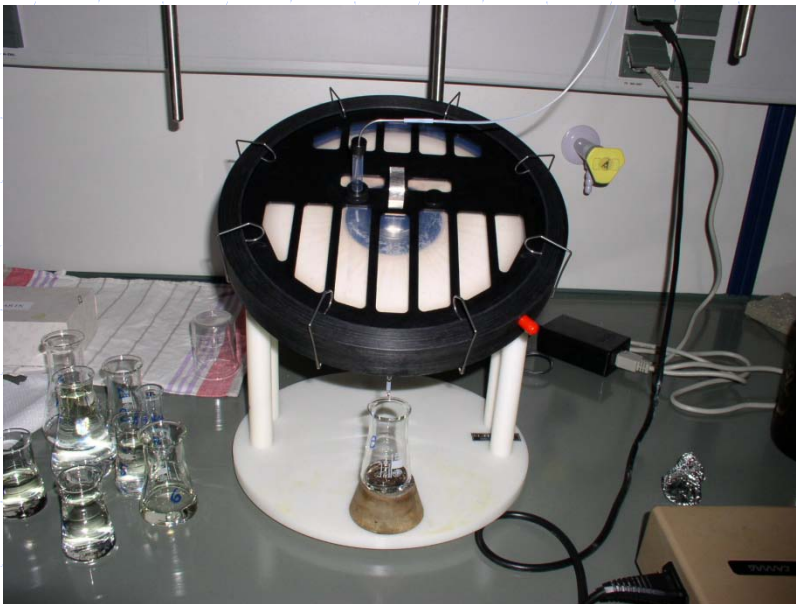
Evolucija kromatografije

◆ Kolonska kromatografija v industriji



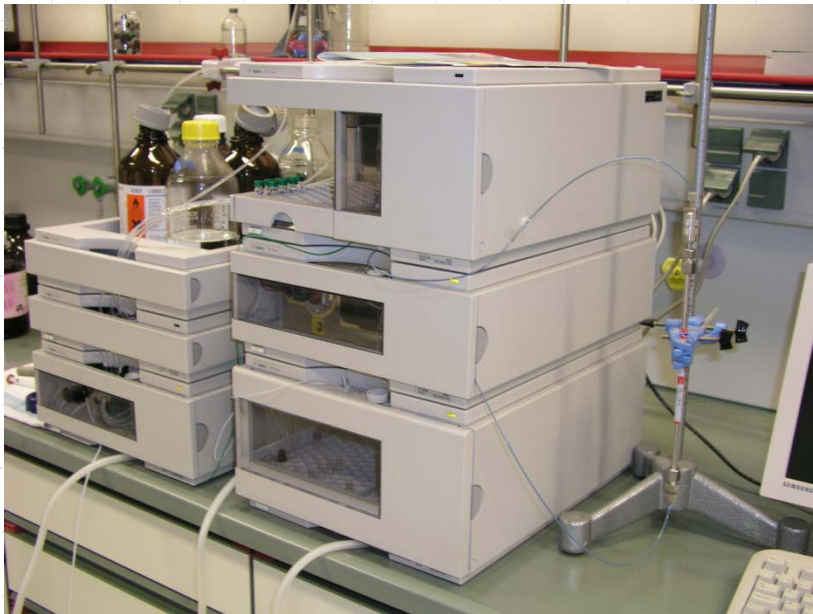
Evolucija kromatografije

◆ Radialna kromatografija



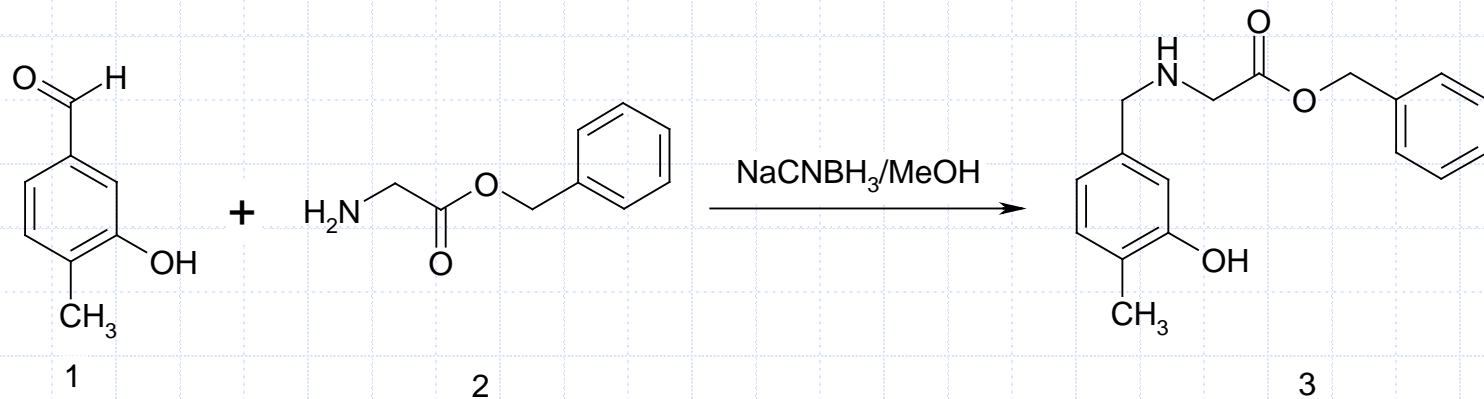
Evolucija kromatografije

◆ HPLC, LC-MS



Naloga 1

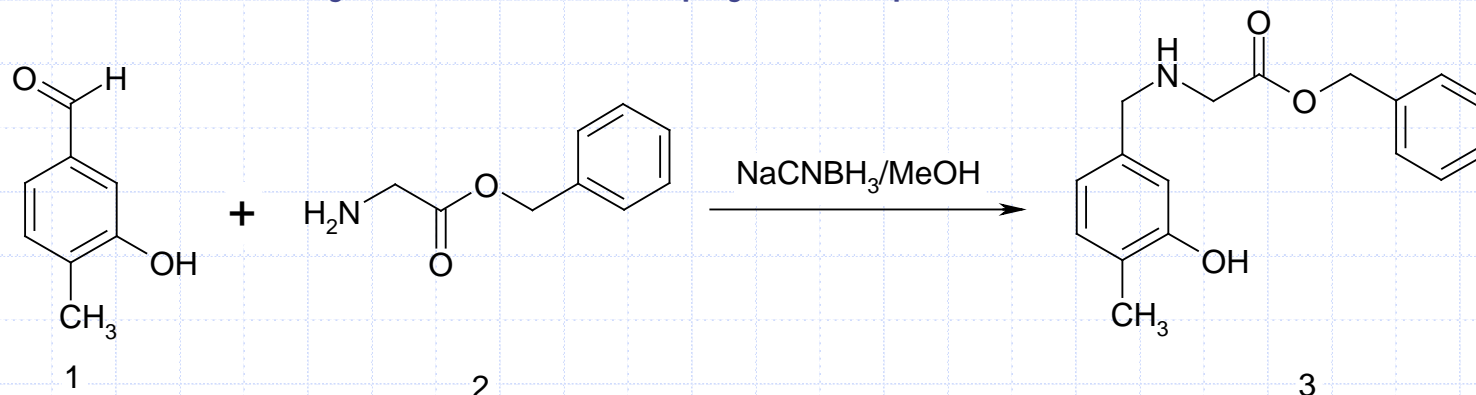
S pomočjo TPK ločujemo naslednjo reakcijsko zmes, ki zaradi nepopolne pretvorbe vsebuje tako izhodni spojin kot produkt:



Predlagajte, kako bi ločili vse tri spojine samo z uporabo orositvenih reagentov in brez standardov. Na TPK kromatogramu bi bilo zaporedje spojin (po naraščajočem R_f) 2, 3, 1. Kakšno bi bilo zaporedje na reverznofaznem TPK (C-18) in MF Acetonitril/voda/CF₃COOH=3/1/0,1?

Naloga 2

S pomočjo TPK ločujemo naslednjo reakcijsko zmes, ki zaradi nepopolne pretvorbe vsebuje tako izhodni spojin kot produkt:



Predlagajte, kako bi ločili vse tri spojine brez standardov z uporabo naslednjih MF:

- ◆ CH₂Cl₂/MeOH/Et₃N=9/1/0,5
- ◆ CH₂Cl₂/MeOH/1% aq. NaOH=3/1/1
- ◆ CH₂Cl₂/MeOH/CF₃COOH=9/1/0,1.

Na TPK kromatogramu bi bilo zaporedje spojin (po naraščajočem R_f) 2, 3, 1. Kakšno bi bilo zaporedje na reverznofaznem TPK (C-18) in MF Acetonitril/voda/CF₃COOH=3/1/0,1?